

癌関連細胞表面受容体の分子認識機構の研究

著者	真壁 幸樹
号	3410
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/8682

氏 名	ま か べ こ う き
授 与 学 位	真 壁 幸 樹
学 位 授 与 年 月 日	博士 (工学)
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	平成 17 年 3 月 25 日
研究科, 専攻の名称	学位規則第 4 条第 1 項
学 位 論 文 題 目	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
指 導 教 員	癌関連細胞表面受容体の分子認識機構の研究
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 熊谷 泉
	主査 東北大学教授 熊谷 泉 東北大学教授 西野 徳三
	東北大学教授 袖岡 幹子

論 文 内 容 要 旨

第 1 章 序論

細胞表面受容体は高等細胞の細胞表面上に発現し、その特異的リガンドとの結合を介して細胞への情報伝達を行う。高等細胞において細胞間の情報伝達は、その恒常性維持に必要不可欠である。このため細胞表面受容体は疾病との関連が強い。受容体へのリガンド結合は細胞内シグナル伝達を介した情報伝達における最初のイベントであり、受容体機能発現の要である。リガンド結合に関する詳細な認識機構解析は生物学的興味のみならず疾病治療薬開発において重要な知見を与えるものである。本論文は、特に癌の免疫療法と関連のある細胞表面受容体を標的として、リガンド認識機構を物理化学的観点から考察した論文であり、全 4 章から構成されている。標的とする細胞表面受容体として、癌細胞上に発現するもの (第 2 章)、および癌の拒絶において重要である白血球細胞上に発現するもの (第 3 章) の二種類に分けて研究を行った。第 2 章では癌細胞上に発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的として、その阻害抗体 528 の認識機構 (§ 1) およびヒト型化における認識機構変化 (§ 2) について調査した。第 3 章では白血球上に発現するインターロイキン 21 受容体 (IL-21R) を標的として、IL-21 調製系の構築及び抗腫瘍活性の評価 (§ 1)、IL-21 の受容体認識機構の解析 (§ 2) を行った。

第 2 章 上皮成長因子受容体を標的とした癌治療の分子論的基盤

本章では、癌細胞上に発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とした。EGFR は多くの癌細胞上に発現し、その悪性化に関与する。このため EGFR の機能阻害による癌の治療が期待される。

第 2 章 § 1 では、EGFR とその機能阻害抗体である 528 抗体を用いて、抗 EGFR 抗体がどのように癌細胞上の EGFR を機能阻害するか研究を行った。抗原である EGFR 細胞外ドメインは動物細胞発現系による調製した。質量分析、ゲルろ過及び超遠心分析から、高度に糖修飾した EGFR が単量体で溶液中に存在していることが分かった。速度論的解析から EGF、528IgG および他の抗 EGFR 抗体である 225 抗体では三者の間に競争的な阻害関係があることが明らかとなった。また、EGFR のドメインを分割し、大腸菌発現系より発現させたドメイン 1、ドメイン 3 を用いた測定から、528IgG は EGFR のドメイン 3 と相互作用していることが示された。遷移状態の解析からは、抗 EGFR 抗体に共通して比較的高いエンタルピー

障壁が観察され、EGFR 認識過程における立体障害が示唆された。以上から、癌細胞の増殖阻害には EGFR のドメイン 3 を標的とすることが有効であることが示唆される。このことは分子の機能を基盤とした抗腫瘍薬剤を開発する上で重要な知見である。

第 2 章 § 2 では、§ 1 で取り上げた 528 抗体を癌治療薬として応用する際に、免疫原性を減少させることを目的に行う抗体のヒト型化（タンパク質工学的にマウス配列からヒト配列への変換操作）において抗原認識能がどのように変化するかを調査した。CDR 移植法によってヒト型化された 528 の Fv 領域の結晶化を行い、三次構造を決定した。得られた三次構造から、ヒト型化 528Fv は CDR 領域で比較的大きな溝を形成しており、また、CDR 領域がほとんど荷電していないことが明らかとなった。滴定型等温熱量計（ITC）を用いた相互作用解析から、ヒト型化 528Fv は EGFR に対する特異性を有しているが、親和力の減少が観察された。CDR 領域の安定性に寄与するとされる残基群である“バーニアゾーン”への系統的な変異導入を行った変異体を九種類作製し、親和力の変化を観察した。結果、すべての変異体は CDR 移植したヒト型化抗体とほぼ同じ親和力に留まったままであった。しかし、ITC 測定から得られた熱力学的パラメータ（エンタルピー変化量、エントロピー変化量）は大きな変動を示していた。例として、重鎖可変領域 48 位は CDRH2 の根本に位置する残基であるが、この残基のマウス配列変異体は抗原認識反応において、マウス型 528Fv と同程度のエンタルピー変化量をもたらした。しかし、エントロピー変化量による相殺によって、結合親和力はヒト型化 528Fv と同程度であった。528Fv、ヒト型化 528Fv 及びその変異体の抗原認識におけるエンタルピー変化量-エントロピー変化量プロットから、バーニア残基変異体間の明瞭なエネルギー補償関係が明らかとなり、この補償関係が親和力回復を妨げる原因であることを見いだした。この結果から、バーニア残基への変異導入は CDR の柔軟性に影響を与えていることが示唆される。ヒト型化におけるエネルギー補償は新規な知見であり、これまで、結晶構造と親和力のみで評価されてきた抗体のヒト型化において、熱力学的測定の重要性が示され、ヒト型化において新しい指針を与えるものとなるだろう。

第 3 章 IL-21 受容体を標的とした癌免疫療法と認識機構の分子基盤

本章では、白血球細胞上に発現し、活性化を介した癌の拒絶に関与するサイトカイン受容体に着目した。サイトカイン受容体として、近年発見されたインターロイキン 21 受容体（IL-21R）を標的とした。そのリガンドである IL-21 は NK 細胞や T 細胞の活性化、増殖を誘導することが報告されており、これら免疫細胞を介した、癌細胞の拒絶が期待される。

第 3 章 § 1 では、IL-21 の癌免疫療法への応用の可能性を調査した。初めに、組み換え体の大量調製系の構築を行った。大腸菌不溶性画分へ発現させた組み換え体 IL-21 は段階透析法による高次構造の回復を試みた。巻き戻し後の IL-21 の CD スペクトルから α -ヘリックスに特徴的なスペクトルが得られ、二次構造が正しく形成していることが示唆された。また、IL-21R 陽性細胞系列を用いたフローサイトメトリー測定から、巻き戻し法によって調製した IL-21 の結合活性が確認された。安定性試験から巻き戻しによって調製した IL-21 は 37℃にて一週間安定であることが示された。細胞増殖試験から IL-21 が IL-2 によって活性化された T 細胞のさらなる増殖を誘導した。活性化 T 細胞を用いた細胞障害性試験では、IL-21 の添加によって癌細胞系列に対する細胞障害性の増加が観察された。IL-21 の抗腫瘍活性誘導は新規な知見である。IL-21 は末梢血単核球の細胞増殖を誘導せず、活性化 T 細胞特異的に増殖を誘導することから、腫瘍局所での特異的な活性化が期待され、このことは医薬品応用の際に副作用の低減に繋がるであろう。

第 3 章 § 2 では、第 3 章 § 1 で抗腫瘍活性が示された IL-21 の受容体認識機構を調査した。IL-21 はそ

の受容体として、特異的受容体 IL-21R、いくつかのサイトカインで共有されている共通 γ 鎖の二種類の受容体と三者複合体を形成することで、細胞内シグナル伝達を発生させる。ホモロジーモデリングによって IL-21 と IL-21R の推定構造を構築したところ、IL-21 表面は正電荷、IL-21R 表面は負電荷に帯電しており、それらの電荷残基は結合界面に位置していた。速度論的解析から、IL-21-IL-21R 間の相互作用は解離速度が比較的遅い安定な複合体形成反応であり、共通 γ 鎖の認識は、IL-21-IL-21R 複合体形成時と比較して解離速度が速い反応であることが分かった。このことから、IL-21 は細胞表面上に発現している IL-21R を最初に認識し、安定な複合体を形成する。その後、細胞表面を巡回する共通 γ 鎖と一過的な三者複合体を形成することでシグナル伝達を行うことが示唆された。これは共通 γ 鎖は細胞上を巡回し、他のサイトカイン受容体複合体の認識に再利用されるモデルを支持する結果である。相互作用の熱力学的測定から IL-21、IL-21R 間の相互作用はエンタルピー駆動型で、共通 γ 鎖の IL-21-IL-21R 複合体認識はエントロピー駆動型で反応が進行することが明らかとなった。このことは受容体認識の各段階で熱力学的パラメータを分けている可能性が示唆される結果である。

第 4 章 総括

本章では本論文の総括を行った。

第 2 章 § 1 から EGFR 認識抗体 528IgG が EGFR のドメイン 3 と結合することで、EGF 等のリガンド結合を阻害し、結果として細胞内シグナル伝達を阻害していることが明らかにした。EGFR は癌治療薬の標的として重要視されており、その活性化阻害機構の詳細解析は意義深い。第 2 章 § 2 からは抗体のヒト型化における抗原認識能の変化を調査し、可変領域フレームワークに位置するバーニア残基の変異が抗原認識においてエンタルピーエントロピー補償を誘導し、結合親和力が変化しないことを明らかにした。第 3 章 § 1 では、IL-21 の抗腫瘍活性について評価し、活性化 T 細胞の癌細胞に対する細胞障害性を増強する活性を発見した。サイトカインの癌治療薬応用は低い副作用が期待され、次世代医薬品として重要である。§ 2 において、IL-21 の受容体認識機構を評価した。速度論的解析から IL-21 は初めに IL-21R と安定な複合体を形成し、共通 γ 鎖が IL-21-IL-21R 複合体を一過的に結合することで細胞内にシグナルを伝達することが示唆された。また、複合体形成過程の熱力学的測定から、この二段階の複合体形成過程が熱力学的駆動力の異なった反応であることを示した。IL-21 の IL-21R 認識はエントロピー駆動であり、その認識特異性との関連が興味深い。本研究で標的としたサイトカイン受容体は細胞間の情報伝達の要であり、疾病との関連も極めて大きい。事実、サイトカイン受容体を標的とした治療薬の開発は、製薬産業で中心的位置を占めつつある。このような状況を鑑みると、受容体作用機構の本質的解明は生物学的興味を越えて、新薬開発に於いても重要となってきたことが分かる。特にサイトカインの受容体認識は最も初期の事象であり、それに続く細胞内シグナル伝達に必要不可欠である。相互作用解析を通して、その作用機構を詳細に調査することは、試行錯誤を越えた、分子論に基づく医薬品開発を目指す第一歩となることが期待される。

論文審査結果の要旨

細胞表面受容体は高等細胞の細胞表面上に発現し、その特異的リガンドとの結合を介して細胞へ情報伝達を行う。高等細胞において細胞間の情報伝達は、その恒常性維持に必要不可欠である。このため細胞表面受容体は疾病との関連が強い。すなわち、細胞表面受容体の関与するリガンド認識機構の解明は生命現象の理解のみならず、疾病治療薬開発の基盤的知見を与えるため、社会的要請が極めて高い。本論文は、特に癌の免疫療法と関連のある細胞表面受容体を標的として、リガンド認識機構の物理化学的観点から考察した論文であり、全4章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の背景及び目的について述べている。

第2章は癌細胞上に広く発現する細胞表面受容体である上皮成長因子受容体(EGFR)を標的として、機能阻害抗体528との相互作用を解析している。§1では、528抗体のEGFR認識機構を研究している。この研究から、528抗体はEGFRの細胞外ドメインに位置するドメイン3を認識し、EGFの結合ドメインへ競争的に結合することから、リガンドの結合阻害を可能にしていることを明らかにした。また、活性化エネルギー解析からEGFR認識抗体が高いエンタルピー障壁を越えて、結合を達成していることを明らかにし、認識過程における立体障害が示唆された。これら、528抗体のEGFR認識機構は新規な知見であり、特に、EGFR機能阻害の分子論的知見は癌治療薬を設計する指針となりうるもので意義深い。§2では528抗体を元のマウス型からヒト型に変換する際の認識機構の変化について述べている。抗体のヒト型化は抗体を医薬品とする際には必要不可欠の技術であるにもかかわらず、これまで、認識機構に与える影響の詳細な熱力学的解析は皆無であった。本研究から、ヒト型化抗体フレームワーク領域のマウス配列変異は、エンタルピーエントロピー補償によって親和力の上昇に繋がらないことを明らかにした。このことから変異によるCDR領域の柔軟性変化が示唆された。この結果はヒト型化抗体の新規な知見であり、ヒト型化抗体設計における従来の方法論に警鐘を与える研究成果である。

第3章では癌の免疫療法において重要な役割を担う免疫細胞に発現する細胞表面受容体、IL-21Rを標的としている。§1では、まずIL-21の癌免疫療法における有用性を評価しており、活性化免疫細胞を用いた測定から、IL-21が高い抗腫瘍活性誘導能を有していることを明らかにした。この結果は世界に先駆けた発見であり高く評価できる。§2ではIL-21の受容体認識機構を速度論的解析から研究している。この研究からIL-21はその受容体であるIL-21Rと共通 γ 鎖と、二段階で結合していることを明らかとした。すなわち、IL-21は初めにIL-21Rと安定な複合体を形成し、その後、共通 γ 鎖がIL-21-IL-21R複合体を一過的に結合することで細胞内にシグナルを伝達することが示唆された。また、複合体形成過程の熱力学的測定から、この二段階の複合体形成過程が熱力学的駆動力の異なった反応であることを示した。IL-21のIL-21R認識はエントロピー駆動であり、その認識特異性との関連が興味深い。

第4章は本論文の総括であり、また、今後の展望を述べている。

以上、本研究では癌治療の観点から細胞表面受容体のリガンド認識機構を調査している。本論文により得られた詳細な認識機構の知見は生物学的興味に留まらず、疾病治療薬開発の基盤的知見を与えるものであり、生物学、特にタンパク質工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。